Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 2, Summer 2023, p. 437-451

Effect of Glycine Betaine Nanocomposite Coated with Chitosan and Moderate Salinity Stress on *In vitro* Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Agria

S. Mahmodi Soreh[1], A. Motallebi Azar[2*], J. Panahandeh[3], G. Gohari[4], A. Jahanian[5]

Received: 02-05-2022 Revised: 26-09-2022 Accepted: 01-12-2022 Available Online: 06-12-2022	**How to cite this article:** Mahmodi Soreh, S., Motallebi Azar, A., Panahandeh, J., Gohari, G., & Jahanian, A. (2023). Effect of glycine betaine nanocomposite coated with chitosan and moderate salinity stress on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Agria. *Journal of Horticultural Science, 37*(2), 437-451. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2022.76343.1165

Introduction

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is an important food and cash crop having the first rank in the world from non grain crops to ensure food security. The tubers produced through the conventional propagation are characterized by low multiplication rate and susceptibility to pathogens. Microtubers are an ideal propagating material for producing high quality seed potatoes. Nowadays, the production, application, and biological risk assessment of nano-scaled products have attracted global concerns in various fields such as agricultural, biotechnological, medicinal, and plant sciences. Chitosan, a biocompatible polymer, has been widely utilized to improve the production of nano-chemicals, thereby improving crop growth, productivity, and immunity. Nanotechnology plays an important role in modern agriculture to address global challenges such as climate change, severity of plant diseases and the limited availability of important plant nutrients. Polymer-based nano-formulations have recently received the greatest attention with the key objectives of developing less harmful, plant growth promoting and protective agents of biodegradable and natural origin. Use of chitosan-based nanoparticles in agriculture field is still in a budding phase. Significant outcomes have been reported in *in vitro* and a few *in vivo* studies in plant growth and protection by chitosan-based nanomaterials.

Materials and Methods

MS medium containing 80 g of sucrose, containing glycine betaine at concentrations of 20 and 40 mg/l, chitosan at a concentration of 240 mg/l, glycine betaine 20 and chitosan 240 mg/l, glycine betaine 40 and chitosan 240 mg/l, 120 mg/l, glycine betaine nanocomposite coated with chitosan 120 and 240 mg/l and control treatment, as well as nonsalinity treatments with the same compounds and concentrations mentioned for salinity were cultured. The study was performed in randomized complete block design with three replications and sixteen treatment. Glycine betaine nanocomposite coated with chitosan were prepared at Maragheh University as follows. Chitosan, glycine betaine, and triphosphate are major consumables. First, chitosan was dissolved well with acetic acid under the influence of temperature. Then, a certain amount of glycine betaine was dissolved in distilled water and added to the chitosan. Tri-polyphosphate (TPP) was dissolved in distilled water at a certain volume ratio and added dropwise to the mixture of chitosan and glycine betaine. The precipitate obtained under the freeze-drying process lead to the preparation of its powder.

1, 2, 3 and 5- Former M.Sc, Associte Professors and Ph.D. Candidate, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email. Motallebiazar@gmail.com)
4- Associte Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2022.76343.1165

Results and Discussion

According to the comparison of the means, treatment of glycine betaine coated with chitosan nanocomposite at a concentration of 120 mg/l produced the highest number of microtuber during the experiment from the first month to the final month. The nanocomposite was more capable of improving growth and biomass than the bare ZnONPs in pepper. The application of the nanocomposite increased the concentration of chlorophylls (51%), carotenoids (70%), proline (2-fold), and proteins (about 2- fold). The supplementation of culture medium with the nanomaterials upregulated enzymatic antioxidant biomarkers (catalase and peroxidase) (Asgari-targhi *et al*., 2021). The highest mean microtuber weight was related to the nanocomposite treatment of 120 mg/l with a weight of 29 mg. In the microtuber diameter, this treatment had the highest value. The results of analysis of variance in Table 1 indicate that the effect of moderate salinity and the interaction of moderate salinity and nanocomposite treatments are not significant and the effect of experimental treatments is significant at the level of 5% probability. Due to the fact that the most important trait in the potato microtuberization is microtuber yield, so in the experiment, the highest microtuber yield was earned nanocomposite treatment with 131 mg and the lowest in control treatment with 87 mg. It seems that by using stress-reducing compounds such as glycine betaine and chitosan and nanocomposites, these compounds increase the amount of genes responsible for the formation of microtuber, and as a result, increasing the proteins involved in stresses induce more microtuberization. Also, nanocomposite materials, more assimilated materials may be transferred from the roots to microtuberization processes.

Conclusion

The microtuber produced in the glycine betaine coated with chitosan nanocomposite treatment produced the highest number of microtubers in the first, second, third, and final months. In treatments with moderate salinity in the first, second, third and final months, the number of microtuber and eyes and sprouted microtubers had the highest amount compared to the treatment without moderate salinity. Also, plants treated with glycine betaine voated with chitosan nanocomposite in the microtuber trate showed a greater effect than chitosan and glycine betaine with chitosan. According to the findings of this study, it seems that the use of nanocomposite materials in increasing the microtuber and reducing the vegetative growth of potato shoots has been made in Agria cultivar.

Keywords: Chitosan, Glycine betaine, Microtuberization, Nanocomposite

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۲، ص. ٤٥۱-٤۳۷

اثر نانو کامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان بر ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی رقم آگریا تحت شرایط تنش شوری ملایم

صدیقه محمودی سوره[۱]- علیرضا مطلبی آذر[۲*]- جابر پناهنده[۳]- غلامرضا گوهری[٤]- امین جهانیان[٥]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰

چکیده

در سال‌های اخیر، کاربرد نانوذرات به طور موفقیت آمیزی در کشت بافت گیاهی استفاده شده است که با به کار بردن این مواد تاثیر شگرفی در حذف آلودگی‌های میکروبی ریز نمونه‌ها و همچنین نقش مثبت این مواد در کالوس زایی، اندام‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی، تنوع سوماکلونال، انتقال ژنتیکی و تولید متابولیت‌های ثانویه داشته است. در این پژوهش اثر نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان در دو غلظت ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی گرم در لیتر، گلایسین بتائین به تنهایی در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، کیتوسان در غلظت ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب گلایسین بتائین ۲۰ و کیتوسان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب گلایسین بتائین ۴۰ و کیتوسان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد در دو وضعیت با تنش شوری ملایم (۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و بدون تنش شوری همراه با ۸۰ گرم ساکارز جهت بررسی صفات مربوط به ریز غده‌زایی سیب زمینی رقم 'آگریا' در شرایط درون کشت شیشه‌ای بررسی شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار و ۳ تکرار اجرا شد. ریز غده‌های تولید شده در تیمار نانوکامپوزیت گلایسین پوشش‌دار شده با کیتوسان در ماه اول، دوم، سوم و چهارم بیشترین تعداد ریز غده را ایجاد نمودند. در تیمارهای دارای شوری ملایم تعداد ریز غده در ماه اول، دوم، سوم و چهارم، تعداد چشم در غده و ریز غده جوانه‌زده بیشترین مقدار را نسبت به تیمار بدون شرایط شوری ملایم دارا بودند. همچنین گیاهان تیمار شده با نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان در صفات اندازه‌گیری شده ریزغده، اثرات مثبت و تاثیرگذار بیشتری نسبت به تیمارهای کیتوسان و گلایسین بتائین همراه با کیتوسان را نشان دادند. با توجه به یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد استفاده از مواد نانوکامپوزیت در افزایش تعداد ریز غده و کاهش رشد رویشی شاخساره سیب زمینی درون شیشه‌ای رقم 'آگریا' موثر واقع شده است.

واژه‌های کلیدی: ریز غده‌زایی، کیتوسان، گلایسین بتائین، نانوکامپوزیت

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) محصولی با تکثیر رویشی است که توسط غده افزایش پیدا می‌کند و این روش باعث افزایش خطرات آلودگی‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی می‌شود. از آنجایی که بیشتر گیاهان درون شیشه‌ای عاری از انواع پاتوژن‌ها هستند اما امکان آلودگی ویروسی آن‌ها وجود دارد. بیماری‌های ویروسی می‌توانند باعث کاهش شدید عملکرد محصول شوند، لذا استفاده از کشت‌های مریستم برای تولید گیاهان عاری از ویروس با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی یک امر ضروری به نظر می‌رسد (Mamiya *et al*., 2020).

از شرایط محیطی تاثیرگذار در ریز غده‌زایی سیب زمینی، نور و دما می‌باشد در حالی که از موارد تاثیرگذار محیط کشت می‌توان به

۱، ۲، ۳ و ۵- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیاران و دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: motallebiazar@gmail.com)
۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران
DOI: 10.22067/jhs.2022.76343.1165

ساکارز، نیتروژن، و تنظیم‌کننده‌های رشد اشاره کـرد (Donnelly *et al*., 2003). با استفاده از کشت بافت امکان تکثیر سریع و تامین حجم انبوهی از ریز غده‌های سالم و عاری از عوامـل بیمـاری‌زا در فواصـل زمانی کوتاه فراهم می‌شود. ریزنمونه‌هـای مختلفـی ماننـد مریسـتم، پروتوپلاست، برگ، میان‌گره و غده، می‌توانند بـرای اهـداف مختلـف کشت بافتی در سیب زمینی استفاده شوند. برای ریزازدیادی در شرایط آزمایشگاهی معمولاً بخش‌های مختلـف سـیب زمینـی ماننـد گـره و میانگره ساقه به عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود. باززایی ساقه از بافت چشم ریز غده نیـز قـبلا گـزارش شـده اسـت (Sadawarti *et al*., 2016). در مطالعات که قبلا انجام گرفته اسـت از قطعـات ریـز غـده بافت کالوس به دست آمده و بعد از آن شاخه‌زایی انجام شده است که به دلیل زمان بر بودن و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال خیلی استقبال نشده است ولی با استفاده از روش مستقیم و بدون ایجاد بافت کالوس می‌توان به شاخساره‌های زیـادی دسـت پیـدا کـرد (Borna *et al*., 2019).

پلی‌ساکارید کیتوسان یک کوپلیمر از ۲- گلوکز آمین و N - استیل D- گلوکز آمین است که به وسیله واکنش داستیله شـدن از کیتـین مشتق می‌شود. کیتین از فراوان‌ترین بیوپلیمرها بعد از سلولز می‌باشـد. این ماده آلی، ترکیب اصلی دیواره‌های سـلولی برخـی از جـانوران از جمله خانواده خرچنگ مانند میگو و خرچنگ، حشرات، پـاتوژن‌هـای گیـاهی و میکروارگانیسـم‌هـا را تشـکیل مـی‌دهـد (Malerba and Cerana, 2020). کیتوسان و مشـتقات آن ویژگـی‌هـای عملکـردی مختلفی را نشان می‌دهند، که این امر را ممکـن مـی‌کنـد کـه بـرای زمینه‌های مختلفی مانند غذایی، آرایشی، پزشکی زیستی، کشـاورزی، حفاظت محیط و مدیریت هدررفت آب اسـتفاده شـود (Shouqiang and Langlai, 2003). کیتوسان با تشکیل یـک غشـا نیمـه تـراوا، تبادلات گازی را تنظیم کرده و تعرق را کاهش می‌دهـد و در نتیجـه رسیدن میوه را بـه تـاخیر مـی‌انـدازد (Jianglian and Shaoying, 2013). همچنین گزارش شده است کـه کیتوسـان باعـث افـزایش سطح آبسیزیک اسید که نقش کلیدی در تنظیم آب با بسـتن روزنـه می‌شود و تعرق را در گیاهان کاهش می‌دهـد (Hidangmayum *et al*., 2019). کیتوسان دارای بارهای یونی مثبت است که این توانایی را به آن می‌دهد تا به طور شیمیایی با بارهای منفی لیپیدها، یون‌هـای فلزی، پروتئین‌ها و ماکرومولکول‌ها پیوند برقرار کند. کیتوسان می‌تواند رادیکال‌های OH و O_2 را از بین ببـرد و دارای ویژگـی محافظـت از DNAاست و تنش‌های محیطی حاصل از خشکی و شوری را کاهش دهد. مولکول‌های کیتوسان پاسخ‌های دفاعی در گیاه به راه می‌انـدازد که منجر به شکل‌گیری سدهای فیزیکی و شیمیایی بر ضد پاتوژن‌هـا می‌شود (Chibu, 2000).

گلایسین بتائین یکی از مهم‌ترین مواد با خاصیت سازگاری اسـت که به عنوان یک محافظ اسمزی عمل می‌کند. گلایسـین بتـائین یـا بتائین یک تری متیـل حاصـل از اسـیدآمینه گلایسـین اسـت کـه از فرآوری محصول چغندرقند حاصل می‌شود. یکـی از راهکارهـایی کـه گیاهان برای سازگار شدن با شـرایط محیطـی نـامطلوب مثـل تـنش شوری، پیش می‌گیرند تجمع ترکیبات با وزن مولکولی پایین است که به مواد سازگاری معروف هستند. اگرچه نقش واقعی گلایسین بتـائین در تحمل به تنش اسمزی گیاه هنـوز مـورد بحـث اسـت، امـا تصـور می‌شود کـه اثـرات مثبتـی بـر یکپـارچگی آنـزیم و غشـا بـه همـراه نقش‌های سازگاری در تعدیل تنظیم اسـمزی در گیاهـان رشـد یافتـه تحـت شـرایط تـنش دارنـد. گلایسـین بتـائین بـه طـور عمـده در کلروپلاست تجمع می‌یابد و دارای نقش حیاتی در تنظیم و محافظـت از غشای تیلاکوئید دارد در نتیجه باعث افزایش کارایی فتوسـنتز مـی شود. گلایسن بتائین اثرات تنش شوری را کاهش می‌دهـد (Ashraf and Foolad, 2007). کاربرد محلول‌پاشی برگی گلایسین بتـائین در گیاهان برنج باعث افزایش معنی‌دار در تحمـل شـوری گیاهـان شـد، همچنـین در گیاهـان گوجـه فرنگـی اسـتفاده محلـول‌پاشـی برگـی گلایسین بتائین باعث افزایش ۴۰ درصدی در عملکرد محصول تحت شـرایط تـنش داشـت (Demiral and Türkan, 2004) همچنـین گلایسین بتائین بیان ژنتیکی چندین پروتئین و آنزیم را تنظیم می‌کند (Castiglioni *et al*., 2018). این ماده در متابولیسم لیپیـدها، قنـد، اتانول نیز دخیل است. اختلالات متـابولیکی ناشـی از مصـرف بـالای اتانول توسط گلایسین بتائین کاهش مـی‌یابـد. همچنـین اخـتلالات متابولیکی مرتبط با متابولیسم چربی و کربوهیدرات را می توان توسـط گلایسین بتائین کاهش داد (Kumar *et al*., 2017).

امروزه بخش کشاورزی به دلیل تغییـر اقلـیم بـا موانـع مختلفـی مواجه است. شهرنشینی، کاهش زمین‌های زراعی، مرگ منابع طبیعـی و غیره از جمله این موانع می‌باشد. از این رو با توجـه بـه افـزایش روز افزون جمعیت جهان افزایش تولید محصولات در درجـه اول اهمیـت قرار دارد . با وجود افزایش قابل توجه سـالانه در کشـت محصـولات، نیاز به عملکرد بیشتر سبب توجه به راهکارهای ویـژه در ایـن زمینـه شده است. بنابراین ایجاد روش‌های مختلـف بـرای افـزایش عملکـرد می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش این کمبـود هـا شـود (Kim *et al*., 2017). این زمینه برای بسیاری از محققـان وجـود دارد کـه بـا استفاده از یک فناوری جدید در جهت تولید کارآمد و سازگار با محـیط زیست که بر اساس روش‌های علمی و خلاقانه ایجاد نمودهانـد باعـث افزایش قدرت گیاه و استقرار گیاه در برابر شرایط تنش‌زای زنده و غیر زنده شوند. به دلیل پیچیدگی بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زای در حـال جهش، مدیریت بیماری‌ها صرفا با یک اقـدام کنترلـی بسـیار دشـوار است. ادغام کـردن علـم نـانو بـا مـواد بیوژنیـک[1] زمینـه جدیـدی از

1- biogenic substances

تحقیقات بـه عنـوان نـانوبیوتکنولوژی[1] را ایجـاد کـرده اسـت. نانوبیوتکنولوژی نقش مهمی در کشـاورزی مـدرن ایفـا مـی‌کنـد کـه می‌توان از این علم در مقابل چالش‌های جهانی ماننـد تغییـرات آب و هوایی، آفات و بیماری‌های گیاهی و دسترسی محدود به مواد غـذایی به صورت برجسته استفاده نمود. این چالش‌هـا مـی‌تواننـد بـا توسـعه نانومواد برای تیمار و محافظت از بیماری‌ها، افزایش توانـایی گیاهـان در جذب مواد مغذی و غیره مورد استفاده قـرار گیـرد. انـواع مختلـف نانومواد که عمدتاً مبتنی بر فلز هستند توسط چندین گروه از محققـان مستقل در زمینه گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Saharan and Pal, 2016). فرمولاسیون نانو مبتنی بر پلیمر اخیراً بیشترین توجـه را به خود جلب کرده اند که دارای مزایایی مانند ضرردهی کمتر، محرک رشد گیاه و عوامل حفاظتی زیست تخریب پذیر همراه با منشاء طبیعی می‌باشد (Meena *et al*., 2020). توانایی کیتوسان در کـلات کـردن یون‌های فلزی مانند Cu^{+2} و Zn^{+2} می‌تواند کامپوزیت کامل بر اساس اصول فناوری نانو ایجاد کند. مطالعات مختلف نشـان داده اسـت کـه بیوپلیمر کیتوسان در برابر اثرات مخرب شرایط تـنش باعـث افـزایش کارایی گیاهان می‌شود که با تأثیرگذاری فیزیولـوژیکی واکـنش‌هـای ایمنی گیاه را مانند مکانیسم‌های دفاعی که شامل آنـزیم‌هـای فنیـل آلانـین آمونیـوم لیـاز، پلـی فنـل اکسـیداز، تیـروزین آمونیـوم لیـاز و آنـزیم‌هـای آنتـی اکسـیدانی SOD، CAT و POD (سوپراکسـید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) هستند را فعال مـی‌کنـد (Akbari *et al*., 2021). افزودن نانو ذرات نقره پوشش دار شـده بـا پکتـین[2] بـه محیط کشت بافت می‌تواند آلودگی باکتریایی را از بین ببرد و پتانسیل مورفولوژیکی ریزنمونه‌ها را افـزایش دهـد (Abedini *et al*., 2020). استفاده از نانوذرات مبتنی بر کیتوسان در زمینـه کشـاورزی هنـوز در مرحله ابتدایی خود قرار دارد. محلول‌پاشی برگی فنیل آنالین پوشش‌دار شده با کیتوسان توانست اسیدیته قابل تیتراسـیون[3]، کـل مـواد جامـد محلول، اسید آسکوربیک، فلاونوئید و فنل کـل، آنتوسـانین و فعالیـت آنزیم فنیل آنالین آمونیالیاز (PAL) را در میـوه انگـور رقـم سـلطانین افزایش دهد و بهبود کیفیـت و افـزایش پتانسـیل آنتـی اکسـیدانی را موجب شود (Gohari *et al*., 2021). بررسی صورت گرفته در پس از برداشت میوه آلو رقم Stanley و برای محافظت از تنش یخزدگـی در شرایط نگهداری در دمای ۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت بـیش از ۴۰ روز نشان داده شـد کـه اسـتفاده از تیمـار نـانوذره گلایسـین بتـائین پوشش‌دار شده با کیتوسان با غلظـت ۰/۵ درصـد وزنـی حجمـی بـه عنوان موثرترین تیمار پس از برداشـت باعـث کـاهش اثـرات آسـیب دیدگی یخزدگی بود (Mahmoudi *et al*., 2022).

با توجه به اهمیت ریزغده‌زایی در مسیر تولیـد انبـوه غـده بـذری عاری از ویروس، این تحقیق آزمایشی برای پاسخ به فرضـیه اسـتفاده از تنش ملایم NaCl جهت القای افزایش ریزغـده‌زایـی همـراه بـا نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسـان بـه عنـوان یک ترکیب جدید برای تاثیرگـذاری بهتـر و بیشـتر در شـرایط درون شیشه‌ای طراحی شده است. لذا این تحقیق اثرات ترکیبات گلایسـین بتائین، کیتوسان و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشـش‌دار شـده بـا کیتوسان بر روی فرآیندهای ریزغده‌زایی در دو شرایط بـدون تـنش و تنش ملایم NaCl بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشـش‌دار شـده بـا کیتوسان

برای تهیه این نانوکامپوزیت، از یک پلیمر زیستی برای بارگیری[4] روی گلایسین بتائین استفاده شد. در ایـن آزمـایش، ۰/۱ گـرم پـودر نانوکامپوزیت با وزن مولکولی کم کیتوسان به ۲۵ میلـی‌لیتـر محلـول اسید استیک ۱ درصد وزنی اضافه شد و به مـدت ۲ سـاعت در دمـای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن مغناطیسـی هـم زده شـد تـا محلول شفاف کیتوسان بدست آید. ۰/۱ گرم گلایسـین بتـائین در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و به محلول کیتوسان اضافه می‌نماییم و سپس به مدت ۱ ساعت با سرعت زیاد توسط همزن مغناطیسـی هـم زده می‌شود. در این آزمایش، سدیم تری پلی فسفات (TPP) به عنوان یک اتصال دهنده فرعی[5] با نسبت ۲/۵ بـه ۱ بـه محتـوای کیتوسـان استفاده شد. در نهایت ۰/۰۴گرم TPP در ۵ میلی‌لیتر آب مقطـر حـل شده و سپس به آرامی به محلول کیتوسان- گلایسین بتـائین اضـافه شد. TPP در حالت اتصال فرعی با نانوذرات کیتوسان باعث انعقاد می شود و این مخلوط منعقد کننده به مدت یک شب هم زده مـی‌شـود و سپس چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد تا مـواد از مـایع رویـی تمیز شود.

مواد گیاهی و شرایط کشت

در این آزمایش از ریز نمونه‌های درون شیشه‌ای عاری از ویروس سیب زمینی رقم 'آگریا' موجـود در آزمایشـگاه کشـت بافـت گیـاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز که تحت شرایط تاریکی ۱۶ سـاعت نوری و ۸ ساعت تاریکی قرار داشتند، اسـتفاده گردیـد. جهـت انجـام کشت، قلمه‌های تک گره از جوانه‌هـای جـانبی گیاهچـه‌هـای درون شیشه‌ای عاری از ویروس تهیه شد. این قلمه‌ها با طول تقریبـی یـک

1- nano-biotechnology
2- Pectin-tagged Nano Silve
3- titratable acidity (TA)
4- loading
5- cross-linker

سانتی‌متر و با رعایت قطبیت به محیط کشت ریزغده‌زایی استریل شده حاوی تیمارهای مورد نظر انتقال یافتند. پس از اتمام فرآیند کشت، شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها به درون اتاقک رشد با شرایط تاریکی مطلق و در دمای ۲± ۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. کشت‌ها به مدت ۴ ماه در این شرایط نگهداری شدند و هر ماه یک بار از آنها یادداشت‌برداری صورت گرفت. در این پژوهش اثر نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان (۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، گلایسین بتائین (۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، کیتوسان (۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، ترکیب گلایسین بتائین۲۰ و کیتوسان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب گلایسین بتائین ۴۰ و کیتوسان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر در دو سطح تنش شوری ملایم (۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و بدون تنش بر ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی در مدت زمان ۴ ماه مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش مقدار ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار مورد استفاده قرار گرفت.

داده‌برداری صفات

بعد از گذشت مدت زمان یک ماه از تاریخ کشت ریز نمونه‌ها، یادداشت‌برداری صفات انجام گرفت. در مرحله ریزغده‌زایی صفات مورفولوژیکی تعداد ریز غده ماه اول، دوم، سوم و چهارم بعد از کشت قلمه‌های تک گره، تعداد استولون، طول استولون (میلی‌متر)، وزن ریز غده (میلی‌گرم)، عملکرد ریز غده (میلی‌گرم در هر تیمار آزمایش) و قطر ریز غده (میلی‌متر) یادداشت برداری گردید. برای اندازه‌گیری صفات از ترازوی حساس(شرکت اوهاس مدل DV215CD ساخت شرکت سوئیس با دقت ۰/۰۰۱ گرم)، برای اندازه‌گیری طول ریز غده و میانگره از خط‌کش و برای اندازه‌گیری قطر ریز غده از کولیس دیجیتال (MITUTOYO) ساخت کشور ژاپن استفاده شد.

تجزیه آماری

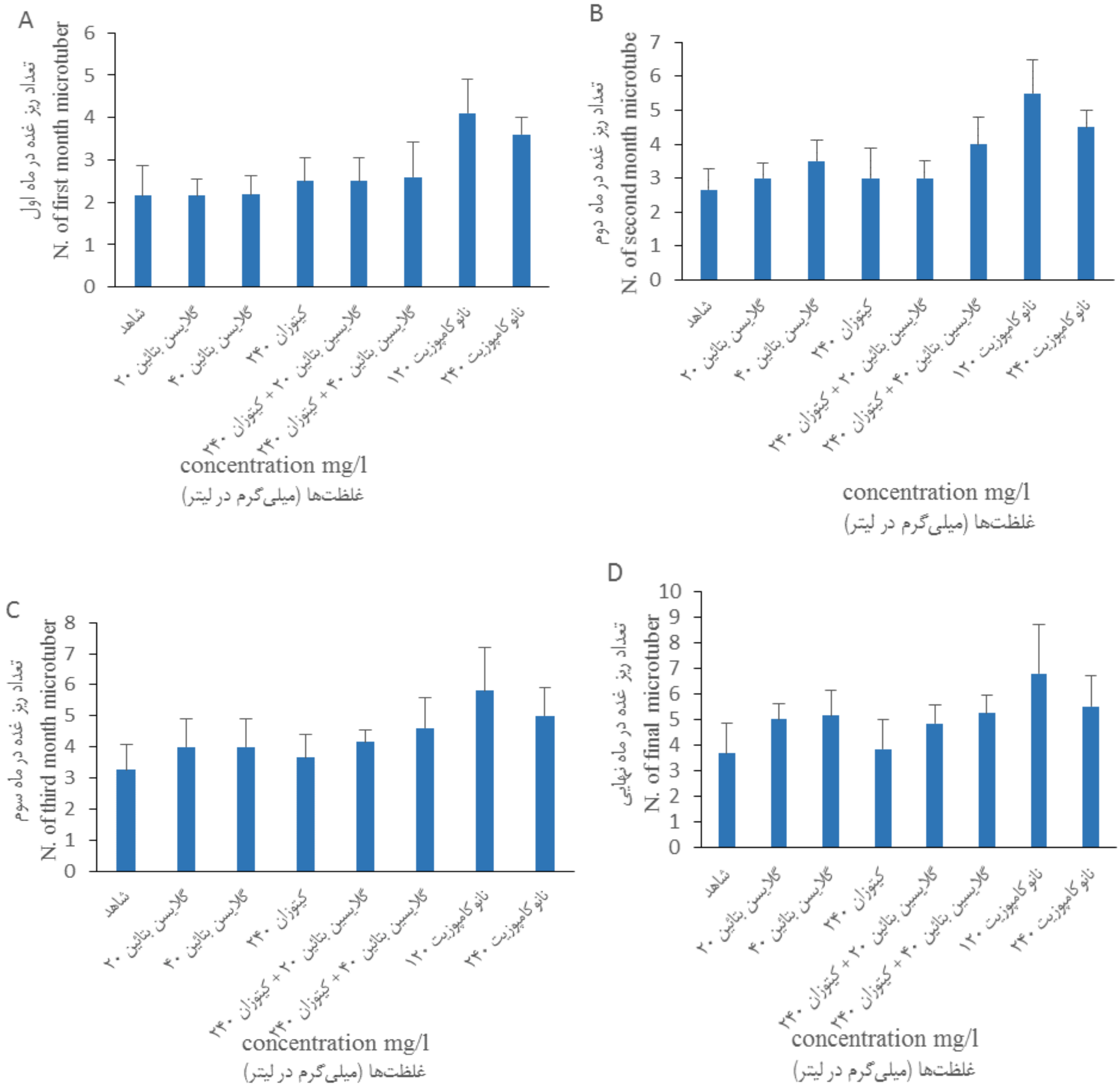
این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار در ۳ تکرار اجرا شد. فاکتور اول تیمارهای گلایسین بتائین، کیتوسان و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان در ۸ سطح و فاکتور دوم شوری ملایم در دو سطح شوری ملایم (۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و بدون شوری بودند. تجزیه آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. کلیه نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

تعداد ریز غده

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، برهمکنش تیمارهای استفاده شده در آزمایش و شوری ملایم در تعداد ریز غده معنی‌دار نبود ولی اثر تیمارها و شوری ملایم در تعداد ریز غده در ماه اول تا نهایی معنی‌دار شد. مقایسات میانگین به دست آمده از آزمون دانکن نشان داد که تیمار نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر در صفت تعداد ریز غده در طول آزمایش از ماه اول تا ماه نهایی بیشترین تعداد ریز غده را به وجود آورد. به طوری که میانگین تعداد در ماه اول ۴/۱ و در ماه‌های دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۵/۵، ۵/۸ و ۶/۸ بود (شکل ۱، A, B, C, D). غلظت ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار نانوکامپوزیت از لحاظ تعداد ریز غده در جایگاه بعدی بیشترین تعداد ریز غده قرار داشت به طوری که به غیر از ماه سوم در بقیه زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین این دو غلظت تیمار نانوکامپوزیت وجود نداشت. در ماه اول و سوم اندازه‌گیری صفت تعداد ریز غده در بقیه تیمارها به جز نانوکامپوزیت هیچ گونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱، A,C). در تیمار گلایسین بتائین همراه با کیتوسان به غیر از ماه دوم در بقیه زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم گلایسین بتائین مشاهده نشد (شکل ۱،B). با استفاده از نتایج جدول مقایسه میانگین تیمارهای شوری ملایم و بدون شوری اختلاف معنی‌داری در این دو شرایط مشاهده شد که تیمارهای با شرایط شوری ملایم باعث افزایش معنی‌داری در تعداد ریز غده در ماه‌های اول، دوم، سوم و چهارم شد. شاید بتوان چنین بیان نمود که با ایجاد شرایط شوری ملایم در ریزغده‌زایی سیب زمینی ریز نمونه‌ها با یک تنش مصنوعی مواجه می‌شوند و در مواجه با این تنش ساز وکارهایی برای مقابله فعال می‌شوند که باعث تحریک آغارش ریزغده می‌شود. با توجه به اهمیت تعداد ریز غده در کشت بافت سیب زمینی و تفاوت معنی‌دار و افزایش تقریبا ۲ برابری که بین تیمار نانوکامپوزیت و تیمار شاهد در ماه نهایی به دست آمد، لذا ضروری به نظر می‌رسد که با استفاده از ترکیبات جدید نانوکامپوزیت در کاربردهای کشت بافت به ویژه در ریز غده‌زایی سیب زمینی از این ترکیبات استفاده نموده و راندمان تعداد ریز غده را افزایش دهیم. در کشت بافت فلفل کاربرد نانوکامپوزیت اکسید روی به همراه کپسوله کردن با کیتوسان، باعث افزایش ۵۱ درصدی در کلروفیل، ۷۰ درصدی کارتنوئید و ۱۰۰ درصدی پرولین و پروتئین شد. همچنین این ترکیب نانو باعث افزایش تجمع ۶۰ درصدی آلکالوئید و ۴۰ درصدی فنول جامد در متابولیت‌های ثانویه شد (Asgari-Targhi *et al*., 2021). اخیرا نانوذرات بر پایه کیتوسان مانند نانوذره کیتوسان روی، کیتوسان مس باعث افزایش میزان رشد و افزایش فعالیت ضد قارچی و باکتریایی در گیاهان مختلف شده است

(Kim *et al*., 2017). استفاده از دو نانوذره نیترات نقره و دی اکسید تیتانیوم در میزان رشد و ریزغده‌زایی سه رقم سیب زمینی باعث تفاوت معنی‌داری در تعداد ریز غده، وزن تر و خشک و ارتفاع گیاهچه شد. به طوری که در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره تیتانیوم تعداد ۲/۴۸ ریز غده به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داده بود (Al-Jibouri *et al*., 2017).



شکل ۱- متوسط تعداد ریز غده سیب زمینی رقم 'آگریا' در تیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان در ماه اول (A)، ماه دوم (B)، ماه سوم (C) و تعداد ریز غده نهایی (D)

$P \leq 0.05$ (بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است)

Figure 1- The average number of microtuber of potato cv. 'Agria' treated by chitosan, glycine betaine and nano composite coated glycine betaine in the first month (A), the second month (B), the third month (C) and the number of fourth month microtuber (D)

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT, $p \leq 0.05$)

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر شوری ملایم و تیمارهای ریز غده‌زایی صفات مورفولوژی سیب زمینی رقم 'آگریا'

Table 1- ANOVA for the effect of moderate salinity and microtuberization treatment on morphological traits of potato microtubers cv. 'Agria'

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی	میانگین مربعات Mean squares											
		تعداد ریز غده ماه اول No. of first month microt uber	تعداد ریز غده ماه دوم No. of second month microt ube	تعداد ریز غده ماه سوم No. of third month microt uber	تعداد ریز غده نهایی No. of final microt uber	تعداد استولون No. of stolon	طول استولون Stolon length	تعداد چشم در ریز غده No. of eye in microt uber	ریز غده جوانه زده Microtub er sprout	شاخه‌رشد یافته‌روی غده Shoot on microtuber	قطر ریز غده Microt uber diamet er	وزن ریز غده Microt uber weigth	عملکرد ریز غده Microtuber yield
شوری ملایم Moderate salinity	1	8.33**	2.33*	3.85*	3.53*	0.32ns	101.58ns	28.7*	1.123**	64.099ns	1.11ns	3.67ns	1989.18ns
تیمار Treatment	7	3.84**	5.81**	4.57**	5.85**	8.37**	900.66**	3.57ns	0.779*	169.261ns	1.91*	27.7*	2064.54*
شوری ملایم × تیمار Moderate ×salinity Treatment	7	0.28ns	0.43ns	0.44ns	0.52ns	2.01ns	183.07ns	3.22ns	0.371ns	40.5ns	1.38ns	4.7ns	308.8ns
Eror خطا	32	0.458	0.771	1.12	1.56	1.89	141.7	2.7	0.214	64.8	0.493	8.3	700.45
ضریب تغییرات C.V (%)		24.48	2327.	21.24	25.29	43.1	76.6	39.12	34.32	27.2	17.9	37.8	26.45

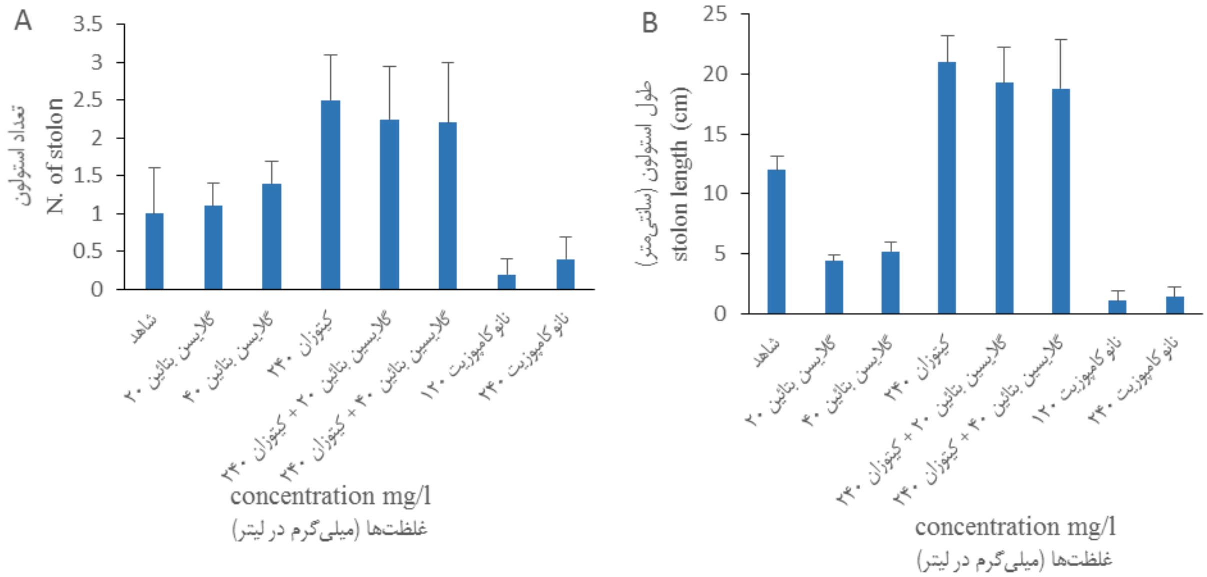
**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.

تعداد و طول استولون

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، برهمکنش اثرات شوری ملایم و تیمارهای نانوکامپوزیت در تعداد و طول استولون معنی‌دار نشد. همچنین اثر شوری ملایم نیز در هر دو صفت فوق معنی‌دار نبود ولی اثر تیمارهای نانوکامپوزیت برای تعداد و طول استولون در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری را نشان داد. بر اساس نتایج شکل ۲ به دست آمده از مقایسات میانگین، تیمارهای نانوکامپوزیت در هر دو غلظت نسبت به بقیه تیمارها تعداد و طول استولون کمتری را داشتند، به طوری‌که تیمار نانوکامپوزیت با غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر با میانگین طول ۰/۲ سانتی‌متر و تعداد ۱/۱ استولون کمترین طول و تعداد استولون را در مرحله ریزغده‌زایی از خود نشان دادند. همچنین تیمارهای کیتوسان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر و گلایسین بتائین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد و طول استولون را ثبت کردند و هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. با توجه به اینکه در میان هورمون‌های گیاهی اسید جیبرلیک بیشترین نقش را در ریزغده‌زایی سیب زمینی دارد و نقش آن به عنوان محرک توسعه استولون بوده و از ریز غده‌زایی جلوگیری می‌کند (Macháčková *et al.*, 1998)، و از سوی دیگر این احتمال وجود دارد که کیتوسان تولید هورمون گیاهی اسید جیبرلیک را در گیاه افزایش می‌دهد که در مطالعه‌ای که اخیرا از نانوذره کیتوسان-آلژینات که به عنوان نانوحامل[1] در گیاه لوبیا استفاده شد در پایان آزمایش این نانوذره کیتوسان به عنوان سیستم حامل برای تولید اسید جیبرلیک شناخته شد (Santo Pereira *et al.*, 2017)، با توجه به این تفاسیر استفاده از کیتوسان به شکل نانوکامپوزیت مرحله ریزغده‌زایی را سمت تولید استولون کمتر و ریز غده بیشتر سوق داد و اثرات منفی کیتوسان در جلوگیری از ریزغده‌زایی را کاهش داد. در مطالعه‌ای انجام شده با استفاده از پاکلوبوترازول که به عنوان ترکیب کاهش دهنده سنتز اسید جیبرلیک شناخته می‌شود در تولید مینی‌تیوبر سیب زمینی رقم سانته انجام شد و اثر محلول‌پاشی برگی این ترکیب سبب کاهش طول استولون شد (Dashti *et al.*, 2013). در پژوهشی دیگر محلول پاشی برگی پاکلوبوترازول در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر در اوایل استولون‌دهی سیب زمینی تعداد ریز غده‌ها را دو برابر نمود ولی تاثیری در عملکرد کل ایجاد نکرد (Bandara and Tanino, 1995). با توجه به شناخته شدن نقش هورمون جیبرلیک اسید در استولون‌دهی سیب زمینی و بررسی نتایج حاصل از این آزمایش، بتوان این فرضیه را محتمل دانست که استفاده از ترکیبات نانوکامپوزیت کیتوسان‌دار هیچ گونه نقش تحریک‌کنندگی در تولید استولون نداشته باشد و برای بررسی بیشتر فیزیولوژیکی، باید رابطه استولون‌دهی و ترکیبات نانوکامپوزیت کیتوسان و کیتوسان معمولی با میزان سنتز جیبرلیک اسید آشکار گردد.

1- nanocarriers



شکل ۲- تعداد استولون (A) و طول استولون (B) سیب زمینی رقم 'آگریا' درتیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان

$P \leq 0.05$ (بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است)

Figure 2- Stolon number (A) and stolon length (B) of potato cv. 'Agria" in chitosan, glycine betaine and coated nano-composite glycine-betaine treatments

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT, *p ≤0.05)*

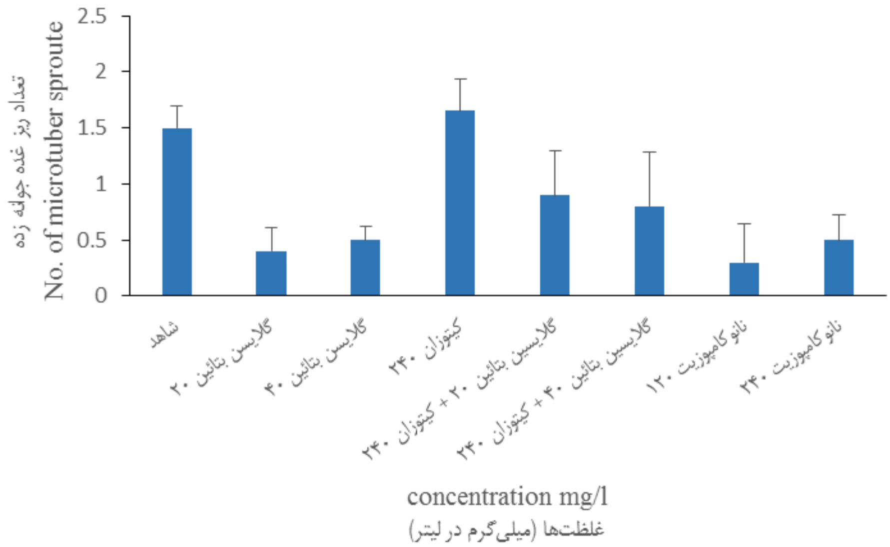
ریز غده جوانه زده

در این پژوهش مشاهده شد که اثرات شوری ملایم و ترکیبات تیماری در این صفت معنی‌دار شدند ولی برهمکنش این اثرات با توجه به جدول تجزیه واریانس معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). در این پژوهش تمامی ریز غده‌های تولید شده بدون دوره رکود بودند و با توجه به شکل ۳ تمامی تیمارها دارای ریز غده جوانه زده بودند که در این میان تیمار نانوکامپوزیت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر با ۰/۳ ریز غده جوانه زده کمترین ریز غده جوانه زده را داشت (شکل ۳). تیمارهایی دارای ترکیبات تعدیل دهنده تنش بودن مانند گلایسین بتائین و گلایسین بتائین همراه با کیتوسان جوانه‌زنی ریز غده را کاهش دادند که یک مزیت خوب برای ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی می‌باشد که در بحث انبارداری و حمل و نقل ریز غده یک عامل مثبت است. در این میان عوامل کاهنده اثرات تنش به صورت ترکیبات نانوکامپوزیت می‌تواند جوانه زنی درون شیشه‌ای را کاهش دهد و آسیب‌های در حین برداشت و انتقال ریز غده‌ها به شدت کاهش پیدا می‌کند. در مقایسه ریز غده جوانه زده در شرایط شوری و با شوری ملایم اختلاف معنی‌داری بین این دو به وجود آمد که در شرایط شوری ملایم ریز غده جوانه زده بیشتری نسبت به شرایط بدون شوری به دست آمد (جدول ۲).

قطر ریز غده

با توجه به نتایج تجزیه واریانس در قطر ریز غده، اثر شوری و برهمکنش شوری ملایم با تیمارهای آزمایش معنی‌دار نشد ولی اثر تیمارهای نانوکامپوزیت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). اختلاف زیادی در قطر ریز غده‌ها در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد و کمترین قطر ریز غده مربوط به تیمار شاهد با ۲/۸ میلی‌متر و بیشترین با ۴/۳۵ مربوط به تیمار نانوکامپوزیت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۴). در بررسی که توسط (Garkeroodi *et al*., 2016) انجام شد کمترین میزان طول و قطر ریز غده مربوط به تیمار شاهد بود و بین تیمار شاهد با سایر تیمارها نیز تفاوت چشمگیری مشاهده نشد. در بررسی صورت گرفته توسط (Mulugeta Diro, 2014) سطوح مختلف ساکارز (۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر) بر قطر ریز غده دو رقم سیب زمینی نشان داد که در غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین اثر مثبت را در ریز غده‌زایی سیب زمینی داشت به طوری که بیشترین قطر ریز غده ۳/۶۰ میلی‌متر بود. با توجه به اینکه در بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته در ریزغده‌زایی سیب زمینی نقش ساکارز در قطر ریز غده برجسته بوده است (Fatima *et al*., 2005) لذا با توجه به داده‌های این آزمایش و تطابق با نتایج محققین دیگر، این فرضیه را می‌توان مطرح نمود که با کاربرد ساکارز بیشتر در محیط کشت یک تنش اسمزی مثبتی ایجاد شده که با استفاده از

تیمارهای تعدیل دهنده تنش مانند گلایسین بتائین و کیتوسان با هم و همچنین به شکل نانوکامپوزیت منجر به افزایش جذب آب و مواد غذایی شده و در نهایت باعث افزایش قطر ریز غده می‌شود.



شکل ۳- تاثیر تیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده بر تعداد ریز غده جوانه زده سیب زمینی رقم 'آگریا'

$P \leq 0.05$ (بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است)

Figure 3- The effect of chitosan, glycine betaine and coated nano-composite glycine betaine treatments on number of sprout micoruber of potato cv. 'Agria"

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT, $p \leq 0.05$)

جدول ۲- تاثیر سطوح شوری بر برخی صفات ریزغده سیب زمینی رقم 'آگریا'

Table 2- Theeffect of salinity levels on some microtuber traits of potato cv. 'Agria'

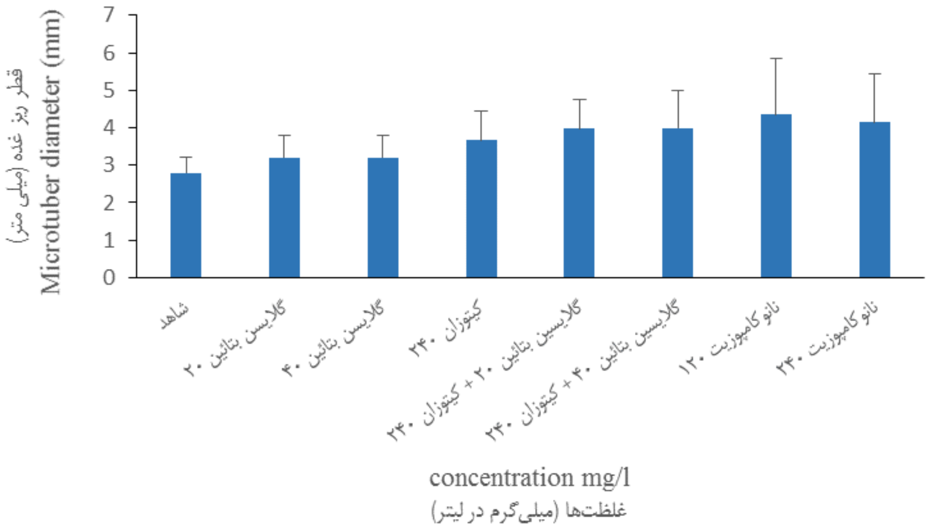
NaCl	**میانگین صفات** **Mean squares**					
	تعداد ریزغده ماه اول No. of first month microtuber	تعداد ریزغده ماه دوم No. of second month microtube	تعداد ریزغده ماه سوم No. of third month microtuber	تعداد ریزغده ماه چهارم No. of fourth month microtuber	تعداد چشم در غده No. of eye	ریز غده جوانه زده Microtuber sprout
بدون شوری Without salinity	2.29± 0.75^{b}	3.21± 0.8^{b}	4.16± 1.16^{b}	4.53± 1.3^{b}	3.46± 1.4^{b}	1.13± 0.21^{b}
با شوری ملایم With moderate salinity	3.12± 0.85^{a}	3.75± 0.96^{a}	4.8± 1.28^{a}	5.167± 1.5^{a}	5.15± 2^{a}	1.36± 0.29^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test.

متوسط وزن ریز غده

نتایج تجزیه واریانس مشاهده شده در متوسط ریز غده نشان داد که اثر شوری و برهمکنش شوری ملایم با تیمارهای آزمایش معنی‌دار نشد ولی اثر تیمارهای نانوکامپوزیت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با توجه به ارتباط مثبتی که بین صفات قطر ریزغده و وزن ریز غده وجود دارد نتایج مقایسات میانگین متوسط وزن ریز غده به دست آمده از شکل ۵ این همبستگی را به طور آشکار نشان می‌دهد به طوری‌که بیشترین متوسط وزن ریزغده مربوط به تیمار نانوکامپوزیت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر با وزن ۲۹ میلی‌گرم می‌باشد



شکل ٤- تاثیر تیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده بر قطر ریز غده (میلی‌گرم) سیب زمینی رقم آگریا

$P \leq 0.05$ (بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است)

Figure 4- Effect of chitosan, glycine betaine and nano composite coated glycine betaine treatments on microtuber diameter (mg)

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT,$p \leq 0.05$)

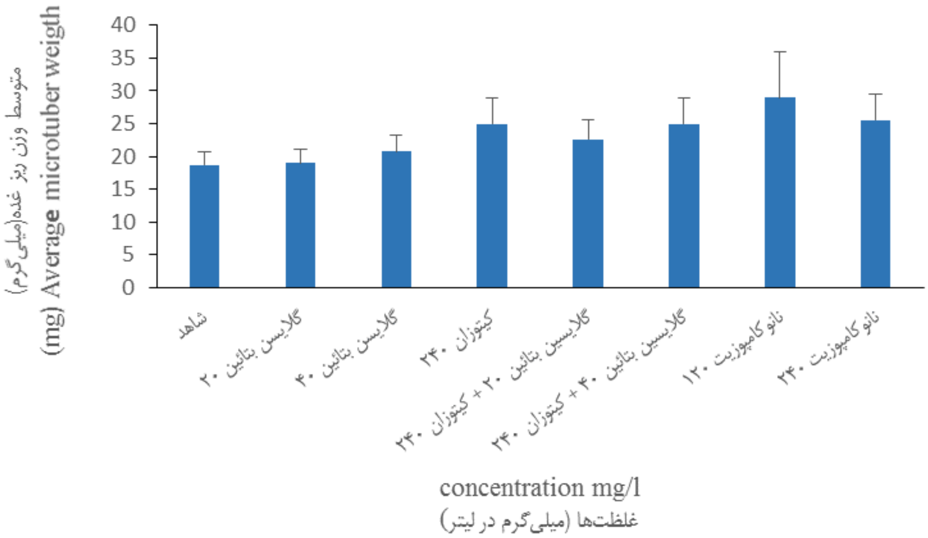
در در قطر ریزغده نیز این تیمار بیشترین مقدار را دارا بود، همچنین با تیمار شاهد و تیمارهای گلایسین بتائین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در بررسی تقریبا مشابه با این آزمایش، با استفاده از نانوذره کبالت در ریز ازدیادی و تشکیل ریزغده سیب زمینی رقم سانتانا[1] مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمایش پس از ۶۰ روز نشان داد که در ترکیب محیط کشت MS همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره کبالت بیشترین اندازه و وزن ریزغده به دست آمد (Hamza, 2019). به نظر می‌رسد با استفاده از ترکیبات کاهش دهنده تنش مانند گلایسین بتائین و کیتوسان و نانوکامپوزیت این مواد، میزان ژن‌های مسئول تشکیل ریزغده افزایش می‌یابد و در نتیجه افزایش پروتئین‌های درگیر در تنش‌ها باعث القای ریزغده‌زایی بیشتر می‌شود (Kwak *et al.*, 2019 ; Guru *et al.*, 2021). همچنین شاید با استفاده از مواد نانوکامپوزیت میزان بیشتری از مواد آسیمیلاته از سمت ریشه به فرآیندهای ریزغده‌زایی انتقال پیدا می‌کنند (Yu *et al.*, 2021).

عملکرد ریز غده

نتایج تجزیه واریانس جدول ۱ از عدم معنی‌داری اثر شوری ملایم و برهمکنش شوری ملایم و تیمارهای آزمایش حکایت دارد و اثر ساده تیمارهای آزمایش در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است. با توجه به اینکه مهمترین صفت در بحث ریزغده‌زایی سیب زمینی عملکرد ریز غده می‌باشد لذا در آزمایش انجام گرفته بیشترین عملکرد ریز غده مربوط به تیمار نانوکامپوزیت با ۱۳۱ میلی‌گرم و کمترین آن در تیمار شاهد با ۸۷ میلی‌گرم به دست آمد (شکل ۶). مقایسه عملکرد ریز غده با سایر صفات اندازه‌گیری شده مشخص نمود که در داده برداری صورت گرفته در طول آزمایش تیمارهای نانوکامپوزیت به خصوص غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر دارای اثرات مثبت و تاثیرگذار بیشتری در ریزغده‌زایی دارد. شاید دلیل قانع کننده برای نتایج به دست آمده از آزمایش ما چنین بتوان توجیه نمود که کیتوسان نیز به عنوان یک محرک زیستی با عملکرد ضدتعرقی خود می تواند به بسته شدن روزنه و کاهش هدر رفتن آب از سطح برگ کمک کند که این عمل کیتوسان را می توان به دخالت آن در مسیرهای ABA نسبت داد (Willmer and Fricker, 1996) و این امر با توجه به نتایج حاصل شده از تاثیر تنظیم کننده‌های رشد منجر به این فرضیه می‌شود که شاید استفاده از ترکیبات نانو بر پایه کیتوسان باعث شود که محرک ریزغده‌زایی در نقش یک ماده بازدارنده طبیعی جیبرلیک

1- santana

اسید و یا یک ماده ضد جیبرلیک اسید نقش ایفا می‌کند (Yagiz *et al.*, 2020). با توجه به اینکه ماده محرک ریزغده‌زایی به احتمال زیاد حالت متوازن و ویژه‌ای از یک یا چند ترکیب می‌باشد لذا شاید بتوان چنین توجیه نمود که استفاده از این ترکیبات جدید در کنار شوری ملایم باعث تحریک بیشتر غده‌زایی می‌شوند.

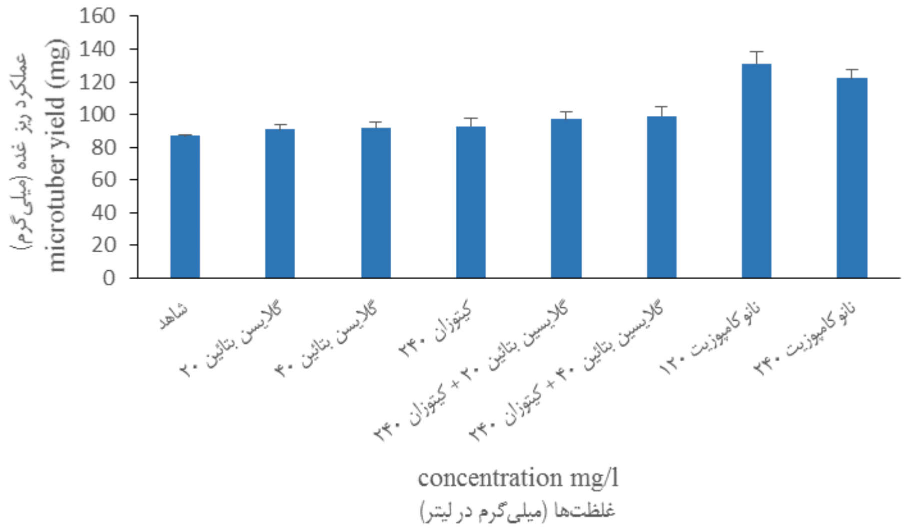


شکل ۵- تاثیر تیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده بر متوسط وزن ریز غده سیب زمینی رقم 'آگریا'

(بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است) P≤0.05

Figure 5- Effect of chitosan, glycine betaine and Nano composite coated glycine betaine treatments on average weight microtuber

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT,*p ≤0.05)*

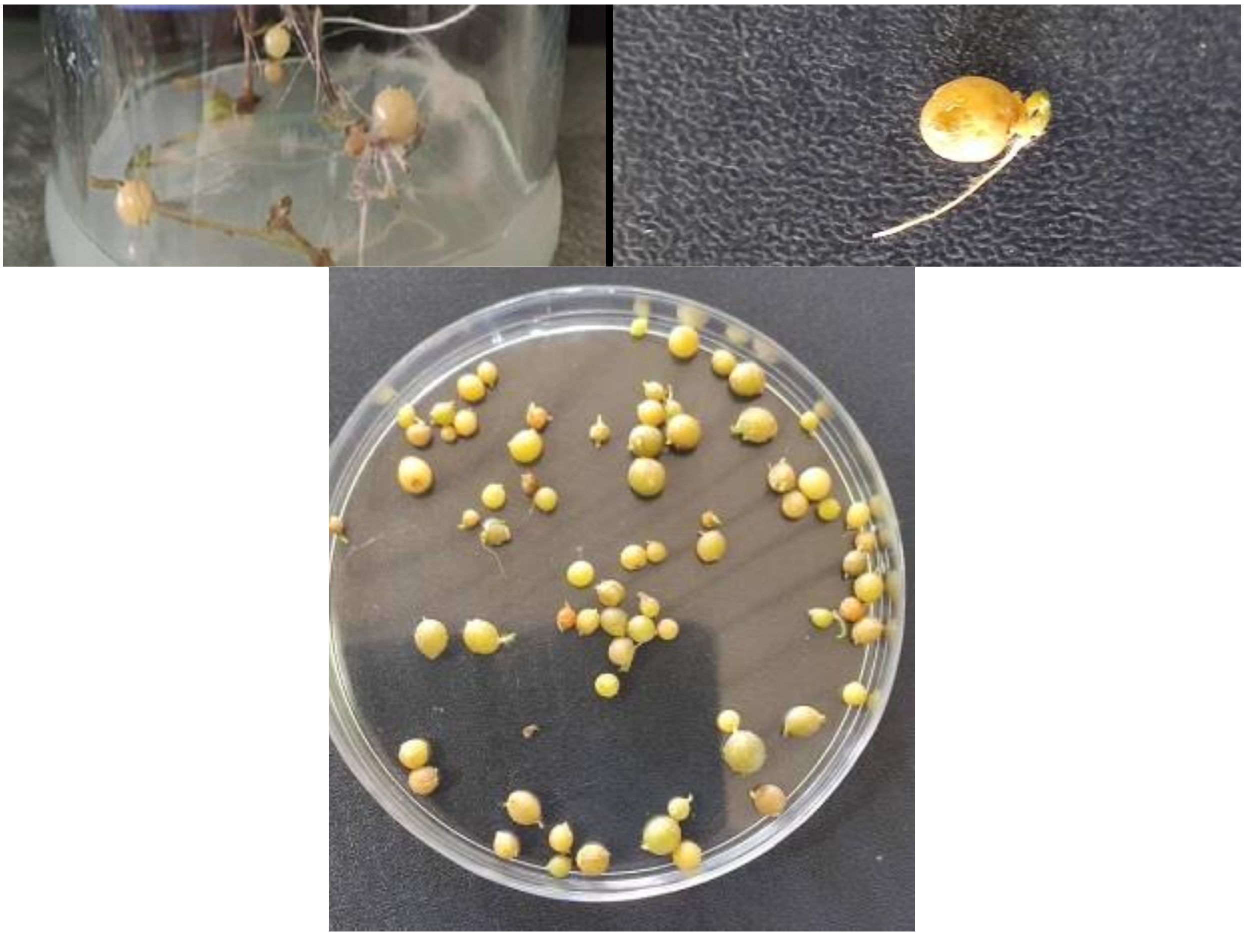


شکل ٦- تاثیر تیمارهای کیتوسان، گلایسین بتائین و نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده بر عملکرد ریز غده سیب زمینی رقم 'آگریا'

(بارهای نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار است) P≤0.05

Figure 6- Effect of chitosan, glycine betaine and Nano composite coated glycine betaine treatments on microtuber yield (mg)

(The graph bars indicate standard deviation) (DMRT,*p ≤0.05)*



شکل ۷- ریز غده تولید شده در ماه اول (بالا سمت چپ)، ریز غده جوانه زده (بالا سمت راست) و تعداد کل ریز غده تولید شده (پایین) در تیمار نانوکامپوزیت غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر در سیب زمینی رقم 'آگریا'

Figure 7- Microtubers produced in the first month (top left) microtuber sprout (top right) and total number of microtubers produced in 120 mg.l^{-1} Nano composite treatment (bottom) in potato cv. 'Agria'

نتیجه‌گیری

در این آزمایش نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان به طور موفقیت آمیز سنتز شد و با توجه به نتایج به دست آمده می تواند در کشت بافت گیاهی و ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. در زمینه ریز غده‌زایی سیب زمینی استفاده از ترکیب نانوکامپوزیت افزایش معنی‌داری در تعداد ریز غده‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد که این افزایش در مراحل آخر ریز غده‌زایی به طور محسوس اثر خود را بروز داد. همچنین استفاده از شوری ملایم همراه با ترکیبات تیماری نانوکامپوزیت بر پایه کیتوسان برای تحریک ریز غده‌زایی موثر می‌باشد که استفاده از این مکانیسم باعث افزایش عملکرد ریز غده‌ها و در نتیجه افزایش شاخص برداشت شد. بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش، غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکامپوزیت گلایسین بتائین پوشش‌دار شده با کیتوسان برای ریز غده‌زایی سیب زمینی غلظت مناسب‌تری می‌باشد.

منابع

1. Abedini, M., Motallebi Azar, A., Zaare Nahandi, F., & Gohari, G. (2020). Application of pectin-tagged nano silver and triacontanol on in vitro microruberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Agria. *Journal of Vegetables Sciences*, *4*(1), 57–70.
2. Akbari, A., Jafari, H., Gohari, G., Kheiri, G., & Mahdavinia, G. R. (2021). Fulvic acid-embedded poly (vinyl alcohol)–zinc oxide hydrogel nanocomposite: synthesis, characterization, swelling and release kinetic. *International Nano Letters*, *11*(4), 347–354.
3. Al-Jibouri, A.M.J., Abed, A.S., Hussin, Z.S., & Abdulhusein, A.A. (2017). Effect of nanoparticles on in vitro

microtuberization of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Biotechnology Research Center*, *11*(1), 57–61.

4. Asgari-targhi, G., Iranbakhsh, A., Oraghi, Z., & Hatami, A. (2021). Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) nanocomposite and its biological assessment in pepper (*Capsicum annuum*) as an elicitor for in vitro tissue culture applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *189*, 170–182. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.117
5. Ashraf, M., & Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 206–216.
6. Bandara, P.M.S., & Tanino, K.K. (1995). Paclobutrazol enhances minituber production in Norland potatoes. *Journal of Plant Growth Regulation*, *14*(3), 151–155.
7. Borna, R.S., Hoque, M., & Sarker, R. (2019). In vitro microtuber induction and regeneration of plantlets from microtuber discs of cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *29*(1), 63–72. https://doi.org/10.3329/ptcb.v29i1.41979
8. Castiglioni, P., Bell, E., Lund, A., Rosenberg, A.F., Galligan, M., Hinchey, B.S., Bauer, S., Nelson, D.E., & Bensen, R.J. (2018). Identification of GB1, a gene whose constitutive overexpression increases glycinebetaine content in maize and soybean. *Plant Direct*, *2*(2), e00040.
9. Chibu, H. (2000). *Effects of chitosan applications on the growth of several crops*. *5*(3), 182.
10. Dashti, F., Parvizi, K., Ashraf, H., Chaeichi, M.R., & Esna Ashari, M. (2013). Effects of different concentrations of paclobutrazul and plantlet density on minituber production in potato cv. Sante. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *44*(1), 11-20.
11. Demiral, T., & Türkan, I. (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of Plant Physiology*, *161*(10), 1089–1100.
12. Donnelly, D.J., Coleman, W.K., & Coleman, S.E. (2003). Potato microtuber production and performance: a review. *American Journal of Potato Research*, *80*(2), 103–115.
13. Fatima, B., Usman, M.U.H.A.M.M.A.D., Ahmad, I.M.T.I.A.Z., & Khan, I.A. (2005). Effect of explant and sucrose on microtuber induction in potato cultivars. *International Journal of Agriculture and Biology*, *7*(1), 63-66.
14. Garkeroodi, P.G., Zaare-Nahandi, F., Azar, A.M., Panahandeh, J., & Dadpour, M.R. (2016). Optimization of in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria) using paclobutrazole and uniconazol. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *47*(2).
15. Gohari, G., Zareei, E., Kulak, M., Labib, P., Mahmoudi, R., Panahirad, S., Jafari, H., Mahdavinia, G., Juárez-Maldonado, A., & Lorenzo, J.M. (2021). Improving the berry quality and antioxidant potential of flame seedless grapes by foliar application of chitosan–phenylalanine nanocomposites (CS–Phe NCs). *Nanomaterials*, *11*(9), 2287.
16. Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P., & Pandey, D.K. (2021). Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition. *South African Journal of Botany*.
17. Hamza, E.M. (2019). Improvement of potato micropropagation and microtubers formation as affected by nanoparticles. *Middle East Journal of Agriculture Research*, *08*(02), 525–532.
18. Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., & Hemantaranjan, A. (2019). Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *25*(2), 313–326.
19. Jianglian, D., & Shaoying, Z. (2013). Application of chitosan based coating in fruit and vegetable preservation: a review. *Journal Food Processing Technology*, *4*(5), 227.
20. Kim, D.H., Gopal, J., & Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. *RSC Advances*, *7*(58), 36492–36505. https://doi.org/10.1039/c7ra07025j
21. Kumar, V., Shriram, V., Hoque, T. S., Hasan, M., Burritt, D.J., & Hossain, M. A. (2017). Glycinebetaine-mediated abiotic oxidative-stress tolerance in plants: physiological and biochemical mechanisms. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, *2*, 111–133.
22. Kwak, S.Y., Lew, T.T.S., Sweeney, C.J., Koman, V.B., Wong, M.H., Bohmert-Tatarev, K., & Strano, M.S. (2019). Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nature Nanotechnology*, *14*(5), 447-455.
23. Macháčková, I., Konstantinova, T.N., Sergeeva, L.I., Lozhnikova, V.N., Golyanovskaya, S.A., Dudko, N.D., Eder, J., & Aksenova, N.P. (1998). Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, *102*(2), 272–278.
24. Mahmoudi, R., Razavi, F., Rabiei, V., Gohari, G., & Palou, L. (2022). Application of Glycine betaine coated chitosan nanoparticles alleviate chilling injury and maintain quality of plum (*Prunus domestica* L.) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, *207*, 965–977.
25. Malerba, M., & Cerana, R. (2020). Chitin- and chitosan-based derivatives in plant protection against biotic and abiotic stresses and in recovery of contaminated soil and water. *Polysaccharides*, *1*(1), 21–30. https://doi.org/10.3390/polysaccharides1010003
26. Mamiya, K., Tanabe, K., & Onishi, N. (2020). Production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using

plastic culture bags. *Plant Biotechnology*, *37*(2), 233–238. https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.20.0312A
27. Meena, M., Pilania, S., Pal, A., Mandhania, S., Bhushan, B., Kumar, S., Gohari, G., & Saharan, V. (2020). Cu-chitosan nano-net improves keeping quality of tomato by modulating physio-biochemical responses. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11.
28. Mulugeta Diro, M.F. (2014). Microtuber induction of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Advances in Crop Science and Technology*, *02*(02), 2–4. https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000122
29. Sadawarti, M.J., Pandey, K.K., Singh, B.P., & Samadiya, R.K. (2016). A review on potato microtuber storability and dormancy. *Journal of Applied and Natural Science*, *8*(4), 2319-2324.
30. Saharan, V., & Pal, A. (2016). Current and future prospects of chitosan-based nanomaterials in plant protection and growth. In *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection* (pp. 43–48). Springer.
31. Santo Pereira, A.E., Silva, P.M., Oliveira, J.L., Oliveira, H.C., & Fraceto, L.F. (2017). Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *150*, 141-152.
32. Shouqiang, O., & Langlai, X. (2003). Effects of chitosan on nutrient qualities and some agronomic characters of non-heading Chinese cabbage. *Plant Physiology Communications*, *39*(1), 21–24.
33. Willmer, C., & Fricker, M. (1996). *Stomata* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
34. Yagiz, A.K., Yavuz, C., Tarim, C., Demirel, U., & Caliskan, M.E. (2020). Effects of growth regulators, media and explant types on microtuberization of potato. *American Journal of Potato Research*, *97*(5), 523-530.
35. Yu, J., Wang, D., Geetha, N., Khawar, K.M., Jogaiah, S., & Mujtaba, M. (2021). Current trends and challenges in the synthesis and applications of chitosan-based nanocomposites for plants: A review. *Carbohydrate Polymers*, *261*, 117904.